



TITLE:

鼠癩系抗酸性菌(所謂鼠癩菌)の化學組成に就て

AUTHOR(S):

明石, 修三; 谷上, 國雄

CITATION:

明石, 修三 ...[et al]. 鼠癩系抗酸性菌(所謂鼠癩菌)の化學組成に就て. 化学研究所講演集 1938, 8: 33-41

ISSUE DATE:

1938-07

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/73636>

RIGHT:

鼠癩系抗酸性菌（所謂鼠癩菌）の化學組成に就て

醫學士 明 石 修 三
谷 上 國 雄

細菌の呈する玄妙不可思議なる諸現象の化學的研究に對しては先づ細菌體を構成する諸成分を究明することが必須にして且つ基礎的な研究事項の一である。此種の研究は既に久しい以前から時々發表されてゐたが、たゞ個々の文獻としての價值を有する程度にすぎなかつた、然るに今を去ること約十年米國の R. J. Anderson 及び其門下によつて結核菌に關して大規模にして且つ系統的なる研究が着手され爾來幾多貴重なる業績が相踵いで發表せられ大いに學界の興味を喚起し此方面の研究に拍車を加へた。即ち此等の人々は人型、牛型、鳥型等の結核菌を始め所謂人癩菌及びチモテー菌等の各種病原性及び非病原性抗酸性菌を大量に培養して先づ菌體を構成する諸成分の系統的分離を行つた。更に各成分中でも就中抗酸性菌の生物學的性狀に最も密接なる關係を有するリポイドに就いては精密な研究をなし、遂に特異化學的性狀を有するのみでなく微妙な生物組織學的反應を發揮する特種脂肪酸の分離に成功し更に其他リポイドに含まれる糖類中にも免疫反應を誘起する物質の存すると云ふ頗る興味ある事實を見出してゐる。一般に細菌は病原性非病原性、或は有用性、有害性の如何を問はず廣く多種類の菌に亘つて研究することを理想とするが、實際上には研究材料採集に種々の困難、障礙が伴ふ關係から其研究對象の選擇範圍が止むを得ず制限されるのは當然であると云へる。

扱余等は上述の方針の下に鼠癩系抗酸性菌の化學的成分を全般に亘つて研究せんとし先づ其分離を企て其成績を第一回報告として此處に纏めて報告する次第である。抑々鼠癩系抗酸性菌と稱するのは曾て鼠癩菌と考へられたが現在では非病原性抗酸性菌の一種と見做され鼠癩系抗酸性菌即ち鼠癩の病竈から分離培養された一種の抗酸性菌と呼ぶのを至當とせられてゐる。従つて此處に所謂鼠癩菌と稱したのも斯様な理由からである。因に癩菌は人癩にせよ鼠癩にせよ其病原菌の培養試験は未だ成功せずたゞ生物體より生物體への傳搬即ち動物試験のみが可能な現狀である。特に本菌を研究材料に選定した理由は該菌が一般抗酸性菌の通有性として培養し易いことリポイド含有量大で細菌リポイドの研究に有利なこと又從來發表せられた數種の類似細菌及び其他の細菌に就ての研究結果と對照比較せんとする諸點である。菌株は長大皮膚科教室より京大微生物學教室に送られ同所に於て約三ヶ年保存せられたものであつて、此處にその

分譲の好意に對し謝意を表す。

實 験 の 部

I. 培 養 方 法

菌體は合成液體培地を用ひて培養した。其組成は Anderson の用ひた Long 無蛋白培地と殆んど同一であるが唯異る點としては高價なアスパラギンの代用にグルタミン酸ソーダを選んだことである。この代用は比較試験によつて菌體收穫上に差支を及ぼさないことが認められた。組成は下記の如くであつて尙液の pH は少量のアンモニヤ水を加へて處定の値 6.8 とした。

| | |
|-----------|---------|
| 蒸 溜 水 | 1000. g |
| グ リ セ リ ン | 50. ヲ |
| 硫酸マグネシウム | 1.0 ヲ |
| 第一磷酸カリ | 3.0 ヲ |
| 炭 酸 ソ ー ダ | 3.0 ヲ |
| グルタミン酸ソーダ | 5.0 ヲ |
| クエン酸鐵アンモン | 0.05 ヲ |
| クエン酸アンモン | 5.0 ヲ |

・ 上記培養液 170 cc を内容 800 cc の滅菌エレンマキヤー、フラスコに分注し、コッホ氏消毒釜にて 100° 1 時間の滅菌を 1 日 1 回二日行ひ、之に菌株を白金筈の助けにて接種し 38° の孵卵器内に 17 日間靜置す。菌膜の發生は 3—4 日目頃より徐々に始り 7—8 日目頃よりは發育頃に旺盛となり淡黄色の褶を有する膜を形成するに至る。培養期間を處定より長くすれば菌膜は次第に培養液にて濕潤して遂に器底に沈下するに至るため、培養を 17 日で打切つた。此培養期間は結核菌の 5—6 週間に比較すれば著しく短く、この事實は一見、菌體採集上に好都合の様に思はれるが然し結核菌、チモテー菌等に比較すれば菌膜が著しく薄い憾があり大量生産には反面それだけ手數がかかる。

II. 採 集 方 法

培養した菌は生菌の儘先づ傾斜法によつて出来るだけ培養液と分け、吸引濾過器に移して濾過し、ついで菌體を生理的食鹽水中に投じて洗ひ再び吸引濾過し、この洗滌操作を更に二回繰返し行ひ、最後に水にて洗滌す。かくして得た濕潤生菌は豆腐搾粕様の外觀を呈し 4000 本の培地より集めた量は總計 10.1 kg. であつた。

III. 成分の抽出及び分離

各成分の抽出及び分離は大概ね Anderson の方法に倣ひ實施したが場所によつては部分的に少しく變化を加へたエーテル、アルコール、アセトン、クロロホルム等の有機溶媒は全部使用

に先ち市販品を蒸溜した上窒素又は炭酸瓦斯を飽和したものを用ひた。又蒸溜、濃縮煮沸等に際して上記の瓦斯を通じ酸化分解を出来るだけ防ぐ注意は怠らずに拂つた。

先づ濕潤生菌は採集後直ちに約 5 倍量のアルコール、エーテル混合溶媒（1：1）中に投じ密栓を施し、時々振盪しつつ室温暗所に 5 週間放置す。ついで吸引濾過し、菌體を 2 倍量の前記混合溶媒に再び浸して 2 週間後吸引濾過し尙一回同様の抽出操作を繰返して最後に同量のエーテルに 1 週間浸し、ついで吸引濾過し菌體は少量のエーテルにて洗滌す。かくして得た三回分のアルコール、エーテル抽出液及び最後のエーテル抽出液を合しアルコール、エーテル抽出液（A）とす。菌體は乳鉢に移し搗つて粉末とし、次にクロロホルム 5 l 中に 4 週間浸し濾過後再び同抽出操作を繰返し、こゝに二回の抽出液を合してクロロホルム抽出液（C）を得た。菌體抽出残渣は乳鉢中にて播りクロロホルムを氣散せしめて粉末となし無水燐酸、パラフィン乾燥器中にて常温減壓下に乾燥し淡黄白色の粉末 940 g を得た、之は蛋白質、核酸、糖類等の菌體諸成分の研究のため保存し菌體抽出残渣（R）とす。

A. リポイドの檢索

前記アルコール、エーテル抽出液（A）は先づエーテルを蒸溜して後減壓下にアルコールの大部分を溜出すれば後に赤褐色の水層と其上面に浮ぶ黄褐色の脂肪層とを残す。之を全部分液漏斗に移しエーテルを以て反覆抽出し、水層（L）とエーテル層とに分けた。この水層（L）は糖類、鹽基性物質等の分離の爲め保存し、一方エーテル層は其中にエーテル不溶性物質を少なからず含んでゐる爲め之を遠心分離し、エーテル不溶分（P₁）を分けた。（P₁）の濾液を蒸發し蒸發残渣に 1 l のエーテルを加へるに全部溶解せず不溶分を分けて（P₁）に合す、かくしてエーテル不溶分を除去したエーテル液即ちエーテル可溶分を含む液に 4 l（4 倍量）のアセトンを加へ室温に於て析出する沈澱を遠心分離しこの沈澱を 3 回アセトンにて洗滌したるものをアセトン不溶分（P）とし（P）の濾液及び洗液を合したるものはアセトン可溶分を含む、之を（F）とす。

1. 脂 肪

（F）を蒸溜して先づ溶媒を除き、蒸溜残渣にエーテル 150 cc を加へて溶解し之に 600 cc のアセトンを加へ 0° C に冷却すれば沈澱を析出す、之を脂肪（F_{II}）とし（F_{II}）の濾液を蒸發して残つた残渣を脂肪（F_I）とす。前者は黄褐色の硬い固體であり後者は褐色の軟い固體である何れも惡臭を存せず。この兩者の融點、窒素、燐、を檢査した結果は第一表に示された通りである。

第 一 表

| | 融 點 | 燐 | 窒 素 % | 收 量 g |
|--------------------|--------|-----|-------|-------|
| (F _I) | 25° | 痕 跡 | 0.07 | 177.6 |
| (F _{II}) | 38—47° | 痕 跡 | 0.05 | 53.0 |

2. 燐 脂 體 (フオスファチド)

先づアセトン不溶分 (P) を 1 l のエーテルに溶解し之に 2 l のアセトンを加へ析出する沈澱を (P₁) とし (P) の濾液に 2 l のアセトンを追加して得られる沈澱を (P₂) とす、又 (P₂) の濾液を窒素氣流中で蒸溜して得られる蒸溜残渣を (P₃) とす。此等 (P), (P₂), (P₃) の 3 フラクチオン及びエーテル不溶分として、さきに得た (P₄) フラクチオンに就いて求め得た融點燐含有量収量を第二表に掲ぐ。

第 二 表

| | 融 點 | 燐 % | 收 量 g |
|-------------------|----------|------|-------|
| (P) | 167—170° | 1.7 | 20.5 |
| (P ₂) | 45—50 | 0.6 | 45.4 |
| (P) | 34—47 | 0.06 | 31.3 |
| (P ₄) | 140—152 | 1.4 | 19.2 |

3. 臘

クロロホルム抽出液 (C) を窒素氣流中にて蒸溜し蒸溜残渣を無水燐酸パラフィン乾燥器中にて常溫減壓下に乾燥すれば帶黃白色の硬き固體を得之を蠟 (W_I) とす、収量 17.8 g である次に其實驗成績を示す。

| | | | |
|-----|-------------|-------|-------------|
| 融 點 |47—50° | 酸 價 | 14.67 |
| 窒 素 |0.11% | 鹼 化 價 |115.1 |
| 燐 |0.13% | 沃 素 價 |25.25 |

4. 燐脂體の精製

a) (P) の精製

エーテル、アセトン法により行ふ。即ち 20.5 g を 60—30 cc のエーテルに溶解し、之に同量のアセトンを加へて沈澱せしむ。この精製法を 10 回連續反覆し最後に得た沈澱は 20 cc のエーテルに溶解し氷冷アセトン 100 cc に攪拌しながら注加すれば細粉狀となつて沈澱しこの沈澱を集めて P₁-a とす。その濾液を蒸發して得たる乾燥残渣を P₁-b とし更に 10 回の精製によつて生じた濾液を合し蒸發乾燥して得たる残渣を P₁-c とす。此等 3 フラクチオンの融點

磷含有量收量は第三表に見る如くである。

第 三 表

| | 融 點 | 磷 % | 收 量 g |
|-------------------|--------|-----|-------|
| P ₁ -a | 210° | 2.3 | 13.0 |
| P ₁ -b | 95—105 | 1.0 | 5.1 |
| P ₁ -c | 34—41 | 0.6 | 2.4 |

b.) (P₂) の精製

(P₂) 44.2 g を用ひ (P₁) と同様にして精製し P₂-a, P₂-b, P₂-c の 3 フラクチオンに分けた。即ち第四表は夫等について求めた融點磷含有量收量を示す。

第 四 表

| | 融 點 | 磷 % | 收 量 g |
|-------------------|-------|-----|-------|
| P ₂ -a | 210° | 2.3 | 3.6 |
| P ₂ -b | 40—42 | — | 5.8 |
| P ₂ -c | 38—43 | — | 34.8 |

(P₃) は 磷含有量極めて少く磷脂體と認め難く従つて精製の必要なく之を省略した。

c.) (P₄) の精製

(P₄) は 元來エーテル不溶分として最初に析出したのであるが磷含有量大であるため磷脂體のフラクチオンとして取扱つた。之は冷エーテルには不溶か又は難溶であるが、熱エーテルには溶解し冷却すれば再び析出する。クロロホルムには易溶であるがアルコール、アセトンは不溶である。之は磷脂體と臘質との混合物であるだらうとの想定の下にこの兩者の分別を次の如くして試みた。

先づエーテル不溶分と可溶分との分離を行つた。即ち 19.2 g の (P₄) を 30 cc エーテルに煮沸溶解して一晝夜放置して析出した。沈澱を遠心分離しこの沈澱を更に 4 回同様に處理し冷エーテル不溶の沈澱と冷エーテル可溶の物質に分ける。冷エーテル可溶性物質を含む全エーテル浸出液は濃縮後氷室に放冷すれば尙一部分不溶分を析出すこの沈澱は前記の冷エーテル不溶の沈澱に合して臘 (W_{II}) とす (W_{II}) の濾液は蒸溜すれば蒸溜残渣 14 g をあたへた。この中には磷脂體が存在する見込の下に (P₁) (P₂) の場合と同様にエーテルアセトン法により精製すること 10 回最後に P₄-a P₄-b の 2 フラクチオンに分けた。従つて (P₄) は W_{II} P₄-a P₄-b の 3 フラクチオンに分別することが出来て、第五表に示す様な成績が得られた。

第 五 表

| | 融 點 | 磷 % | 收 量 g |
|-------------------|---------|-----|-------|
| P ₄ -a | 210° | 2.3 | 1.5 |
| P ₄ -b | 125—135 | 1.5 | 13.2 |
| W _{II} | 65 | 0.5 | 3.5 |

5. 磷脂體精製結果に基く總リポイドの綜合的吟味

以上述べた精製操作によつてアセトン不溶分 (P) 即ち粗製磷脂體フラクチオンは、磷脂體 (P_I) (P_{II})、脂肪 (F_{III}) 及び臘 (W_{II}) の 3 つに分けることが出来ると考へられ、其各々は次の説明によつて明かである。

(P_I) : P₁-a P₂-a 及び P₄-a を含み融點 210° 磷含有量 3.3% Molisch 反應を強く呈し、一般磷脂體に共通の親水性を示し容易に水と乳濁液をつくる又極めて吸濕性であるが粉末狀となし得る。之は最も純度の高い磷脂體と考へてよい收量 18.1 g.

(P_{II}) : P₁-b 及び P₄-b とを含み、融點 100—135° 磷含有量 1.0—1.5 %, Molisch 反應は陽性で親水性あり、容易に水と乳濁液をつくる。之は不純なる (P_I) と見て差支へない。

(F_{III}) : P₃ 全部と P₂-b, P₂-c, P₁-c とよりなる、之は殆んど磷を含有せず、融點も低い。エーテルに可溶であつて少量のエーテルに溶解したるものにアセトンを加へると室温にても又冷却すれば一層容易に沈澱する。Molisch 反應陰性親水性もなく、水と乳濁液をつくらず、之は磷脂體フラクチオンに混入して來た脂肪と考へることが出来る。收量 86.0 g.

(W_{II}) : 融點 65° の脆い固體で非吸濕性の粉末となる。冷エーテルには不溶、熱エーテルには可溶である磷を含有せず Molisch 反應は微弱で親水性を有しない、收量 3.5 g.

以上述べた結果より總リポイドは次の如く綜括して觀察することが出来る。

$$\text{總リポイド} \left\{ \begin{array}{l} \text{磷脂體} \left\{ \begin{array}{l} \text{P}_I \quad (\text{F}_1\text{-a}, \text{P}_2\text{-a}, \text{P}_4\text{-a}) \\ \text{P}_{II} \quad (\text{P}_1\text{-b}, \text{P}_4\text{-b}) \end{array} \right. \\ \text{脂 肪} \left\{ \begin{array}{l} \text{F}_I \\ \text{F}_{II} \\ \text{F}_{III} \quad (\text{P}_3, \text{P}_2\text{-b}, \text{P}_2\text{-c}, \text{P}_1\text{-c}) \end{array} \right. \\ \text{臘} \left\{ \begin{array}{l} \text{W}_I \\ \text{W}_{II} \end{array} \right. \end{array} \right.$$

B. 水溶性物質の検索

1) 鹽基性物質の分離

アルコール、エーテル抽出液 (A) より分離したる水層 (L) に之と分けたエーテル層の水洗液を合し減壓にて 4 l に濃縮し之に 500 cc の 20 % 醋酸鉛液を加へ生じたる白色沈澱を

濾過し、濾液に硫化水素を通じ硫化鉛の沈澱を除き、ついで減壓濃縮して約 500 cc に至らしむ。之に 5 % の濃度となる様に硫酸を加へ 30 % 燐タングステン酸を沈澱の起らなくなるまで加へる。燐タングステン酸の所要量は約 600 cc である。沈澱を吸引濾過し 5 % 硫酸にてよく洗滌した後沈澱を水酸化バリウムを以て分解し過剰のバリウムは硫酸にて定量的に除去し、遊離鹽基溶液を減壓濃縮し最後に硫酸乾燥器中に減壓乾燥す。こゝに黒褐色無定形固體 3.4 g を得て、之を鹽基性物質 (B) とし各成分の分離に保存す。

2) 糖類の分離

燐タングステン酸の沈澱の濾液は水酸化バリウムを加へて燐タングステン酸及び硫酸をバリウム鹽として除き過剰のバリウムは炭酸ガス及び硫酸を以て除き濾液を約 250 cc に減壓濃縮す。濃縮液に市販次醋酸鉛液及びアムモニヤ水 (20%) を沈澱の起らなくなる迄加ふ。所要量各約 2000 cc である。生じた白色沈澱を濾過し水にてよく洗滌後沈澱を水に懸遊せしめ硫化水素を通じて分解す。硫化鉛の沈澱を濾過し濾液をノーリットにて處理して脱色後減壓濃縮し最後に無水燐酸上に常溫減壓乾燥し、こゝに甘味ある黃褐色飴狀物質 (S) 約 34 g を得た。

a) Trehalose の分離

飴狀物質 (S) を固化せんとして無水アルコールを加へて處理したるによく之に溶解して目的を果さずよつてこのアルコール溶液を減壓濃縮し約 50 cc となし冷所に放置すれば無色菱形柱狀結晶現る。一晝放置し結晶を充分析出せしめたる後吸引濾過し結晶を 95 % アルコールにて洗滌す。收量 2.1 g。結晶は甘味を有し其儘では Fehling 液を還元せず硫酸にて煮沸すれば著明に還元作用を示すに至る Pentose の Orcin 反應, Fructose の Resorcin 反應は共に陰性である。結晶を 85 % アルコールより一回再結晶すれば融點 210° を示し Trehalose との混融試験に於て融點降下せず。

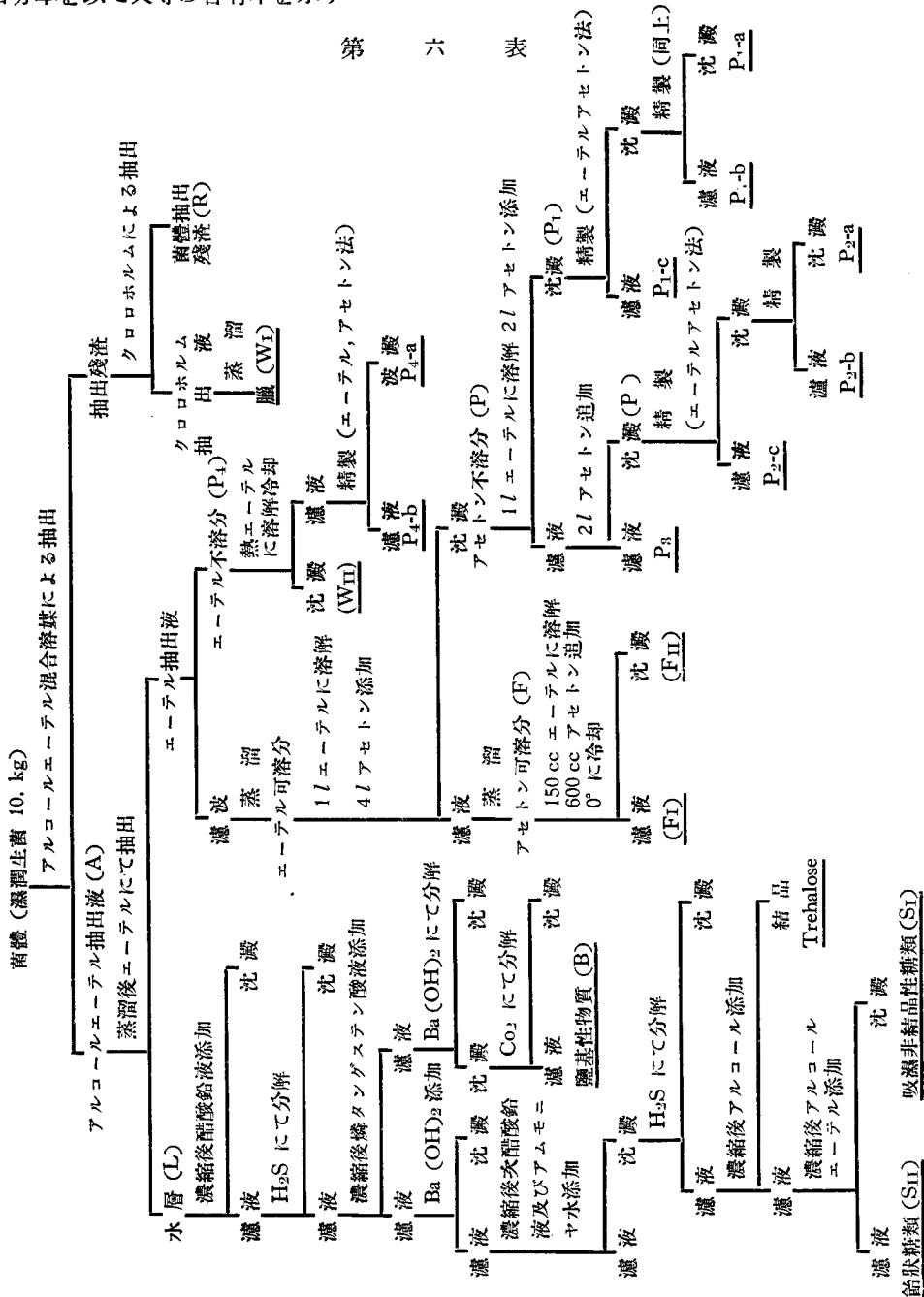
b) 他の糖類の分離

Trehalose の結晶を析出した母液は更に減壓蒸溜ついで硫酸乾燥器中にて濃縮し粘稠なる飴狀物質とし之を無水アルコール約 1 l 中に投入するに殆んど之に溶解す。之に無水エーテル約 2 l を加ふれば白色絮狀の沈澱を生じ之を吸引濾過し沈澱をアルコール、エーテルにて洗滌後速かに無水燐酸乾燥器に入れて乾燥す。かくして白色の輕き無定形粉末 5.0 g を得。之を糖類 (S_I) とす (S_I) は極めて吸濕性にして空氣中に短時間放置するも濕潤して飴狀に凝り水には極めて易溶である。この點 Trehalose と異なる。甘味は少しくあるも Trehalose には遙に及ばず。還元作用なく酸にて加水分解すれば著明に現る。又 Orcin 反應及び Resorcin 反應共に陰性でこれ等の點は Trehalose に似てゐる。

(S_I) を除いた濾液は再び減壓蒸溜し最後に硫酸乾燥器中に濃縮し再び粘稠なる 飴 狀 物 質 25.5 g を得た。之を糖類 (S_{II}) とす。

以上述べた菌體各成分の分離操作の概要を略記すれば第六表の如くなる。又第七表にては菌體より分離した脂肪、磷脂體、臘、鹽基性物質、糖及び菌體抽出残渣の各收量を一括し、同時に百分率を以て夫等の含有率を示す。

第 六 表



第 七 表

| | | |
|-------------|----------|----------|
| 總 リ ポ イ ド | 375.1 g | 27.76 % |
| 脂 肪 | 316.6 ヲ | 23.44 ヲ |
| 磷 脂 體 | 37.2 ヲ | 2.75 ヲ |
| 臘 | 21.3 ヲ | 1.57 ヲ |
| 糖 類 | 32.6 ヲ | 2.41 ヲ |
| 鹽 基 性 物 質 | 3.4 ヲ | 0.25 ヲ |
| 菌 體 抽 出 殘 渣 | 940.0 ヲ | 69.58 ヲ |
| 總乾燥菌體成分 | 1351.1 g | 100.00 % |

尙已に研究發表せられた他の抗酸性菌の成績と我等の求め得た成績とを次表（第八表）によつて比較することにしよう。

第 八 表

| | 人 結 核 型 菌 | 牛 結 核 型 菌 | 鳥 結 核 型 菌 | チ モ テ ー 抗 酸 性 菌 | 癩 菌 | 鼠 癩 系 菌 抗 酸 性 菌 |
|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------------|---------|-----------------|
| 磷 脂 體 | 6.54 % | 1.53 % | 2.26 % | 0.59 % | 2.25 % | 2.75 % |
| 脂 肪 | 6.20 ヲ | 3.34 ヲ | 2.19 ヲ | 2.75 ヲ | 6.47 ヲ | 23.44 ヲ |
| 臘 | 11.03 ヲ | 8.52 ヲ | 10.79 ヲ | 4.98 ヲ | 9.98 ヲ | 1.57 ヲ |
| 總リポイド | 23.78 ヲ | 13.40 ヲ | 15.26 ヲ | 8.37 ヲ | 18.70 ヲ | 27.76 ヲ |
| 糖 類 | 0.87 ヲ | 1.09 ヲ | 1.02 ヲ | 3.90 ヲ | 0.92 ヲ | 2.41 ヲ |
| 菌 體 抽 出 殘 渣 | 75.01 ヲ | 85.50 ヲ | 83.71 ヲ | 87.70 ヲ | 80.38 ヲ | 69.58 ヲ |

上表を一覽すれば本菌は總リポイドの含有量に於て最も勝れてゐることが先づ看取される。リポイドの各個の成分に就いては磷脂體は左程著しい差を認めないが脂肪が斷然多くリポイドの大部分を占め臘の含有量は遙かに劣つてゐる。糖類も矢張り優位を示してゐる。之等の各成分の詳細に亘つては目下研究を續行中で次報に於て發表することにする。稿を終るに臨み本研究に際して獎學資金を與へられたる服部報公會に對して厚く謝意を表する次第である。